

Effects of L-serine on oxidative stress indices and histopathological changes of pancreas in streptozotocin-induced diabetic mice

Mahshad Sheikhi Narani¹, Akram Vatannejad², Asma Kheirollahi³, Farzaneh Ershad Langeroudi⁴, Sara Shokrpour⁵, Samira Alizadeh⁶, Asie Sadeghi⁷

1. Doctor of Veterinary Medicine, Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0003-2986-7962.

2. Assistant Professor, Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran (Corresponding Author). Tel: +98-21-61117132, Email: vatannejad@ut.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-8202-7914.

3. Assistant Professor, Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. Tel: +98-21-61117132, Email: kheirollahi_asma@ut.ac.ir. ORCID ID: 0000-0002-5976-3892.

4. Doctor of Veterinary Medicine, Department of Comparative Biosciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran (Co first Author). ORCID ID: 0000-0003-1888-5161.

5. Assistant Professor, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0002-4054-290X.

6. PhD of clinical biochemistry, Iranian Research Center on Aging, University of Social Welfare and Rehabilitation Sciences, Tehran, Iran. ORCID ID: 0000-0001-6059-2181.

7. Assistant Professor, Department of Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, Kerman University of Medical Sciences, kerman, Iran. ORCID ID: 0000-0001-5241-9856.

ABSTRACT

Background and Aim: Diabetes mellitus is a metabolic disorder with an increasing global prevalence that can lead to premature death. High blood glucose is the main lab. abnormality in diabetes mellitus which occurs as a consequence of disorder in pancreatic insulin secretion or function. L-Serine supplementation regarded as safe by the FDA can improve glucose homeostasis and reduce homeostasis model assessment-estimated insulin resistance (HOMA-IR) and oxidative stress. The aim of this study was to investigate the effects of L-serine intake on oxidative stress indices and histopathologic changes in the pancreas of diabetic mice.

Materials and Methods: In order to conduct this study, 18 c57bl/6 male mice were purchased and divided into 3 groups (control, diabetic control and diabetic mice treated by L-serine).

Diabetes induced by chemical method (streptozotocin, 200 mg/kg). After four weeks of oral administration of L-Serine (approximately 280 mg/day/mouse), animals were euthanized by guillotine and blood samples and pancreas tissues were obtained to determine biochemical parameters, oxidative stress indices and pathological changes.

Results: The results of this study showed that oral administration of the supplement of L-Serine in diabetic mice could help to lower blood sugar levels and could lead to increased catalase enzyme activity ($P<0.05$) but had no significant effect on the levels of MDA, cholesterol and triglyceride. On the other hand, histopathological changes showed a slight reduction in diabetes-induced pancreas damage in mice treated with L-serine.

Conclusions: These findings showed that the supplement of L-Serine may have a protective effect against the diabetes-induced pancreas damage by lowering blood sugar and improving oxidative stress status.

Key words: Diabetes, L-Serine, Pancreas, Oxidative stress, Histopathology, Amino acid

Received: Jan 22, 2023

Accepted: July 29, 2023

How to cite the article: Mahshad Sheikhi Narani, Akram Vatannejad, Asma Kheirollahi, Farzaneh Ershad Langeroudi, Sara Shokrpour, Samira Alizadeh, and Asie Sadeghi. Effects of L-serine on oxidative stress indices and histopathological changes of pancreas in streptozotocin-induced diabetic mice. SJKU 2023;28(5):1-12.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

اثرات ال سیرین بر شاخص های استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیک پانکراس در

موش های دیابتی القا شده با استرپتوزوتوسین

مهشاد شیخی نارانی^۱، اکرم وطن نژاد^۲، اسماء خیراللهی^۳، فرزانه ارشاد لنگرودی^۴، سارا شکرپور^۵، سمیرا علیزاده^۶، آسیه صادقی^۷

۱. دکتری دامپزشکی، گروه علوم زیستی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۷۹۶۲-۲۹۸۶-۰۰۰۳-۰۰۰۰.

۲. استادیار، گروه علوم زیستی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران (نویسنده مسئول). پست الکترونیک: vatannejad@ut.ac.ir، تلفن: ۹۸+۲۱-۶۱۱۷۱۳۲.

۳. استادیار، گروه علوم زیستی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۳۸۹۲-۵۹۷۶-۰۰۰۲-۰۰۰۰.

۴. دکتری دامپزشکی، گروه علوم زیستی مقایسه ای، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۵۱۶۱-۱۸۸۸-۰۰۰۳-۰۰۰۰.

۵. استادیار، گروه آسیب شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران. کد ارکید: ۲۹۰۸-۴۰۵۴-۰۰۰۲-۰۰۰۰.

۶. مرکز تحقیقات سالمندی، دانشگاه علوم توانبخشی و سلامت اجتماعی، تهران، ایران. کد ارکید: ۲۱۸۱-۶۰۵۹-۰۰۰۱-۰۰۰۰.

۷. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کرمان، کرمان، ایران. کد ارکید: ۹۸۵۶-۵۲۴۱-۰۰۰۱-۰۰۰۰.

چکیده

زمینه و هدف: دیابت شیرین یک اختلال متابولیک با گسترش جهانی است که می تواند منجر به مرگ زودرس شود. گلوکز خون بالا علامت اصلی دیابت است که در این بیماری بدن به مقدار کافی انسولین تولید نمی کند یا نمی تواند به طور مؤثری از آن استفاده کند. مکمل ال سیرین که توسط FDA ایمن تلقی می شود می تواند هومئوستاز گلوکز را بهبود بخشد و سبب کاهش مقاومت به انسولین با روش مدل ارزیابی هموستاز (HOMA-IR) و استرس اکسیداتیو شود. هدف از این مطالعه بررسی اثرات دریافت ال سیرین بر شاخص های استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیک پانکراس موش های دیابتی بود.

مواد و روش ها: به منظور انجام این مطالعه تعداد ۱۸ سر موش نر سویه c57bl/6 تهیه و به ۳ گروه (کنترل، دیابتی و دیابتی تحت درمان با ال سیرین) تقسیم شدند. دیابت به روش شیمیایی (استرپتوزوتوسین، تک دوز ۲۰۰ میلی گرم / کیلوگرم وزن بدن) القاء شد. بعد از چهار هفته دریافت تقریبی ۲۸۰ میلی گرم / در روز / موش از ال سیرین در آب آشامیدنی روزانه، موش ها آسان کشی شده و نمونه های خون و بافت پانکراس جهت بررسی پارامترهای بیوشیمیایی، استرس اکسیداتیو و تغییرات پاتولوژیک مورد استفاده قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج این مطالعه نشان داد که مصرف خوراکی مکمل ال سیرین می تواند در موش های دیابتی به کاهش سطح قند خون کمک کرده و منجر به افزایش فعالیت آنزیم کاتالاز شود ($p < 0.05$). با این حال، کاهش در میزان مالون دی آلدئید بافت پانکراس، کلسترول و تری گلیسرید سرمی به سطح معنی داری نرسید. از طرفی بر اساس نتایج میکروسکوپی بافت پانکراس، بهبودی خفیف در تغییرات هیستوپاتولوژیک در موش های دیابتی تحت تیمار با ال سیرین مشاهده شد.

نتیجه گیری: این یافته ها نشان دهنده آن است که مصرف دوز تعیین شده از ال سیرین احتمالاً می تواند با کاهش گلوکز خون و بهبود استرس اکسیداتیو تا حدودی اثر محافظتی بر آسیب پانکراس ناشی از دیابت داشته باشد.

کلمات کلیدی: دیابت، ال سیرین، پانکراس، استرس اکسیداتیو، هیستوپاتولوژی، آمینواسید

وصول مقاله: ۱۴۰۱/۱۱/۲، اصلاحیه نهایی: ۱۴۰۱/۴/۲۶، پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۷

در شرایط استرس اکسیداتیو، تولید ۱-دئوکسی اسفنگولیپیدها نیز افزایش می‌یابد (۷) که برای سلول‌های بتای پانکراس سیتوتوکسیک می‌باشند و همچنین باعث شدت پانکراتیت ناشی از دیابت می‌شود. از طرفی، متابولیسم آمینواسیدها در بیماران دیابتی دچار تغییرات می‌شود، به طوری که افزایش نسبت آلانین به سرین یکی از مهم‌ترین این تغییرات است که باعث می‌شود از آلانین (یا گلايسین) به جای سرین برای سنتز اسفنگولیپیدها استفاده شود که متعاقباً تولید ۱-دئوکسی-اسفنگولیپیدها به عنوان ترکیبات غیرطبیعی را به دنبال خواهد داشت (۸، ۲).

در گذشته آمینواسید ال‌سرین به عنوان آمینواسید غیرضروری در نظر گرفته می‌شد، ولی امروزه به عنوان یک آمینواسید ضروری وابسته به شرایط در نظر گرفته می‌شود؛ زیرا نمی‌تواند به میزان کافی در بدن تولید شود تا همه‌ی نیازهای سلولی را برآورده کند (۹). ال‌سرین در افزایش حساسیت به انسولین و ترشح آن، عملکرد میتوکندریایی و بهبود استرس شبکه آندوپلاسمی نقش دارد (۱۰). علاوه بر این، ال‌سرین پیش‌ساز گلايسین و سیستئین است که دو آمینواسید مهم برای بیوسنتز گلوکوتایون محسوب می‌شوند. گلوکوتایون فراوان‌ترین تیول غیرپروتئینی است که سبب حفاظت در برابر استرس اکسیداتیو می‌شود (۱۱) که در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد (۱۲). کاهش غلظت پلاسمایی سرین در هر دو نوع دیابت گزارش شده است (۱۳-۱۵). اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت‌کنندگی سلولی ال‌سرین در تعدادی از مطالعات گزارش شده است (۱۶-۱۸)؛ لذا به نظر می‌رسد که ال‌سرین به واسطه اثرات آنتی‌اکسیدانی خود بتواند در بهبود شکایات و عوارض دیابت مؤثر باشد که در تعداد محدودی از مطالعات به اثرات مفید ال‌سرین بر دیابت اشاره شده است (۱۹، ۱۰).

اختلال عملکرد پانکراس و در نتیجه عدم تولید انسولین به میزان کافی نقش به سزایی در بروز دیابت دارد. از جمله مکانیسم‌های دخیل در آسیب سلول‌های بتای پانکراس،

هنگامی که بدن به مقدار کافی انسولین تولید نمی‌کند یا نمی‌تواند به طور مؤثری از آن استفاده کند، دیابت رخ می‌دهد که منجر به هایپرگلیسمی می‌شود (۱). در صورتی که بیماران دیابتی از درمان مناسبی برخوردار نشوند، صدماتی در بافت‌های مختلف از قبیل قلب و عروق، کلیه، چشم و پانکراس ایجاد خواهد شد (۱). دیابت ریسک پانکراتیت، کاهش یا از بین رفتن عملکرد سلول‌های بتای پانکراس و کاهش قابلیت بازسازی سلول‌های پانکراس را بالا می‌برد (۲).

هایپرگلیسمی، هایپرلیپیدمی و التهاب از اصلی‌ترین مشخصه‌های دیابت هستند که از طریق ایجاد استرس اکسیداتیو، استرس شبکه آندوپلاسمی، نقص در اتوفازی و اختلال در عملکرد میتوکندری به بافت پانکراس صدمه می‌زنند (۳). استرس اکسیداتیو به معنی عدم تعادل میان تولید رادیکال‌های آزاد و دفاع آنتی‌اکسیدانی است (۴). سلول‌های بتای پانکراس در مقابل استرس اکسیداتیو و متعاقباً صدمات آن بسیار حساس هستند؛ زیرا تولید اندوژن گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) در بافت پانکراس زیاد است، این درحالیست که ظرفیت آنتی-اکسیدانی کمتری نسبت به سایر اندام‌ها دارند (۵). در این راستا نشان داده شده است که میزان بیان ژن‌های آنتی-اکسیدانی سوپراکسید دیسموتاز، گلوکوتایون پراکسیداز و کاتالاز به ترتیب چهار، پانزده و سه برابر در سلول‌های بتای پانکراس کمتر از بقیه سلول‌ها است. علاوه بر این، میزان این آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی با کاهش بیشتری مواجه می‌شود که خود باعث تشدید عوارض دیابت می‌شود (۵). عواقب این عدم تعادل در اکسیداسیون و احیا شامل پراکسیداسیون لیپیدی (MDA: مالون دی آلدئید بعنوان نشانگر آسیب غشای سلول)، اکسیدشدن پروتئین‌ها و آسیب به DNA و نهایتاً آپوپتوز است که به طور قابل توجهی سبب ناکارآمدی و مرگ سلول‌های بتای پانکراس در دیابت شیرین می‌شوند (۷، ۶).

استرس اکسیداتیو است. چندین مطالعه اثرات سودمند ال سرین را بر دیابت و برخی جنبه‌های آن به اثبات رسانده‌اند، با این وجود، تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر ال سرین بر استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس موش‌های دیابتی نپرداخته است. هدف از این مطالعه بررسی اثر ال سرین بر شاخص‌های استرس اکسیداتیو و تغییرات هیستوپاتولوژیک در بافت پانکراس موش‌های دیابتی شده است.

مواد و روش‌ها

برای این مطالعه از ۱۸ سر موش نر خالص c57bl/6 با وزن متوسط ۲۵-۲۰ گرم و با سن تقریبی ۸-۶ هفته استفاده شد. حیوانات از مجتمع تولیدی تحقیقاتی انستیتوپاستور ایران خریداری و به حیوان خانه دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران منتقل شدند. برای هر ۳ موش یک قفس مناسب در نظر گرفته و در شرایط استاندارد در دمای 23 ± 2 درجه سانتی‌گراد با رعایت دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی/ ۱۲ ساعت تاریکی با تهویه مناسب نگهداری شدند. در طی آزمایش، خوراک مناسب موش و همچنین آب تازه به غیر از دوره‌های محرومیت از غذا همواره در اختیار حیوانات بود. کلیه مراحل تحقیقاتی این مطالعه با رعایت ملاحظات اخلاقی مطابق با بیانیه هلسینکی انجام شده است (کد اخلاق: IR.UT.VETMED.REC.1401.012).

بازه زمانی پنج روزه برای عادت کردن موش‌های مذکور با محیط در نظر گرفته شد و موش‌ها به طور تصادفی به سه گروه تقسیم شدند: گروه کنترل: شامل ۶ موش نر سالم که تنها با خوراک نرمال بدون دریافت هیچ‌گونه درمانی تغذیه شدند. گروه دیابتی: شامل ۶ موش نر دیابتی شده با استرپتوزوتوسین (STZ) بود که تحت هیچ تیماری قرار نگرفتند. گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین: شامل ۶ موش نر دیابتی شده که به مدت ۴ هفته با استفاده از ال سرین حل شده در آب آشامیدنی تحت درمان قرار گرفتند.

در این آزمایش برای القای دیابت در ۱۲ موش گروه‌های دیابتی، بعد از چهار ساعت گرسنگی به هر موش یک دوز (۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم وزن بدن) استرپتوزوتوسین (STZ، شرکت سیگمای آمریکا) محلول در بافر سیترات سرد (۰/۱ مول با $\text{pH} = 4.5$) به روش داخل صفاقی تزریق شد (۲۱، ۲۰). به موش‌های کنترل (غیر دیابتی) نیز معادل حجمی بافر سیترات تزریق شد. پس از ۷۲ ساعت خون‌گیری از ورید دمی برای سنجش قند خون با استفاده از دستگاه گلوکومتر (گلوکوکارد ۰۱، ساخت شرکت آرکری ژاپن) انجام گرفت و موش‌هایی که قند خون ناشتا بیش از ۲۰۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر داشتند، به عنوان مدل دیابتی در نظر گرفته شدند. با توجه به این که قند خون تمامی موش‌های مورد تزریق با STZ بالاتر از این مقدار بود، القای دیابت در تمام آن‌ها مورد تأیید قرار گرفت و وارد مطالعه شدند.

تقریباً هر موش روزانه ۲۸۰ میلی‌گرم از پودر ال سرین (شرکت بایوبیسیک، کانادا) که به صورت محلول در آب آشامیدنی (به‌طور میانگین ۴ میلی‌لیتر روزانه) آن‌ها تهیه شده بود را دریافت کردند (۱۹، ۲۱). پس از چهار هفته از زمان تجویز ال-سرین، وزن بدن موش‌ها ثبت شد، سپس حیوانات آسان‌کشی شده و نمونه‌های خون از ورید گردن گرفته شدند. در ادامه بافت پانکراس با نهایت دقت و ظرافت توسط متخصص پاتولوژی دامپزشکی با توجه به آناتومی این بافت و اتصالات آن به بافت‌های مجاور بدون پارگی و له‌شدگی از معده و دئودنوم جدا شد. سپس از سکوم و روده بزرگ نیز جداسازی شد و جهت ارزیابی‌های بیوشیمیایی و پاتولوژی مورد استفاده قرار گرفتند. بافت‌های پانکراس مورد نیاز برای ارزیابی استرس اکسیداتیو در فریزر 70°C - تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند. بخشی از پانکراس نیز برای ارزیابی پاتولوژیک در بافر فرمالین خنثی ده درصد قرار داده شد. نمونه خون تازه بلافاصله بعد از انعقاد با دور 3000g سانتریفیوژ شد و سپس سرم جداسازی شده در فریزر 70°C -

برای بررسی و مقایسه نتایج از نسخه ۹ نرم افزار graph pad prism استفاده شد. همچنین به منظور تعیین وجود اختلاف معنی دار میان گروه های آزمایشی از روش تحلیل واریانس یک طرفه (one-way ANOVA) و تست تعقیبی دانت (Dunnett post hoc test) استفاده شد و نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ گزارش شدند. در تمام مقایسه ها سطح $p < 0.05$ به عنوان معیار اختلاف معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

وزن بدن موش های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل به طور قابل توجهی کاهش یافت ($p < 0.01$)؛ ولی تفاوت معنی داری بین موش های دیابتی تحت درمان با ال سرین و گروه دیابتی مشاهده نشد (شکل ۱).

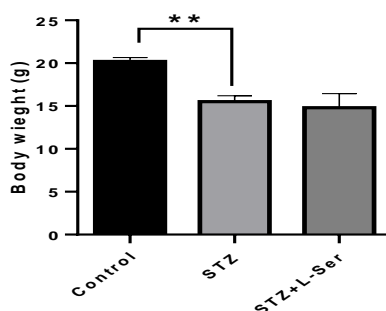
همان طور که در مطالعه قبلی گزارش شده است، گلوکز در گروه دیابتی نسبت به کنترل به طور معنی دار افزایش یافته ($p = 0.01$) و مقدار آن در گروه دیابتی تحت تیمار با ال-سرین نسبت به گروه دیابتی به طور معنی داری کاهش یافت ($p = 0.02$) (جدول ۱) (۲۱). مقدار تری گلیسرید سرم در گروه های مورد مطالعه تفاوت معنی داری نداشت (جدول ۱). با این حال، میزان کلسترول سرم در گروه دیابتی نسبت به کنترل به طور معنی دار افزایش یافت ($p < 0.001$)؛ ولی کاهش آن در گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین معنی دار نبود (جدول ۱).

تا زمان انجام آزمایش های بیوشیمیایی ذخیره شدند. قند، کلسترول و تری گلیسرید در نمونه های سرم تصادفی با استفاده از کیت های بیوشیمیایی پارس آزمون اندازه گیری شدند. برای اندازه گیری مالون دی آلدئید و کاتالاز (CAT) ابتدا بافت پانکراس از فریزر $^{\circ}\text{C} - 70$ خارج شد و با اضافه نمودن بافر فسفات به بافت پانکراس (نسبت ده به یک) عمل هموژنیزاسیون با استفاده از هاون آزمایشگاهی و دستگاه سونیکاتور صورت گرفت. سپس نمونه های هموژن با دور ۱۲۰۰۰ به مدت ده دقیقه در دمای $^{\circ}\text{C} 4$ سانتریفیوژ شدند. غلظت پروتئینی محلول شفاف فوقانی (سوپرناتانت) با روش برادفورد مورد سنجش قرار گرفت (۲۲). مابقی سوپرناتانت برای ارزیابی مقدار MDA و فعالیت کاتالاز استفاده شد. مقدار MDA (شماره کاتالوگ: TPR-MDA-96T) و فعالیت کاتالاز (شماره کاتالوگ: TPR9806A) با استفاده از کیت های طب پژوهان رازی اندازه گیری شدند. جهت ارزیابی های هیستوپاتولوژیک، برش هایی به ضخامت پنج میکرون از بلوک های پارافینی تهیه شد و رنگ آمیزی هماتوکسیلین-انوزین (H&E) انجام شد. مقاطع هیستوپاتولوژی بافت پانکراس با میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت. از مقاطع بافتی مورد نظر، عکس و فیلم توسط دوربین دیجیتال 2250 U eye با نرم افزار میکروبین نسخه دو تهیه شد و در نهایت بارگذاری تصاویر با نرم افزار Axiovision نسخه ۴/۸ انجام شد و مورد بررسی پاتولوژیست قرار گرفت.

جدول ۱. مقادیر گلوکز، تری گلیسرید و کلسترول در گروه های مختلف مورد مطالعه.

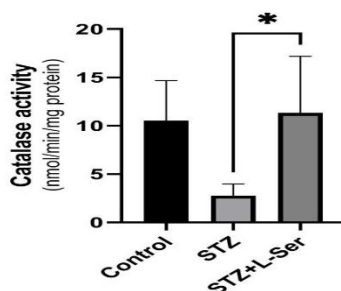
پارامتر سرمی	گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین	گروه دیابتی	گروه غیر دیابتی
گلوکز (mg/dl)	188.6 ± 69.22^b	$398.5 \pm 170.3^{a,b}$	175.8 ± 27.46^a
تری گلیسرید (mg/dl)	72.50 ± 15.00	98.38 ± 31.79	79 ± 17.46
کلسترول (mg/dl)	106.3 ± 39.45	126.9 ± 16.70^a	80.83 ± 14.29^a

حروف مشابه نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین گروه ها است (ارزیابی از طریق تست ANOVA و تست تعقیبی دانت). نتایج به صورت $\text{Mean} \pm \text{SD}$ نشان داده شده است.



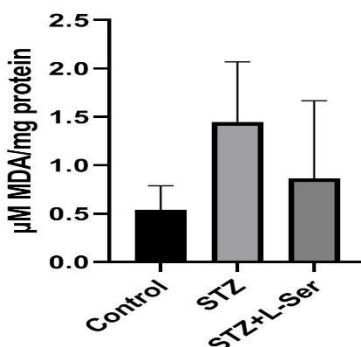
شکل ۱. وزن موش‌ها در گروه‌های مورد مطالعه. (ارزیابی از طریق تست ANOVA و تست تعقیبی دانست). Control: گروه کنترل، STZ: گروه دیابتی، STZ + L-Ser: گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین ($p < 0.01$, **).

فعالیت آنزیم کاتالاز در گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین (دیابتی (1.19 ± 0.77 nmol/min/mg protein) به طور معنی‌داری افزایش یافت ($P < 0.05$) (شکل ۲).



شکل ۲. اثر ال سرین بر فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت پانکراس (ارزیابی از طریق تست ANOVA و تست تعقیبی دانست). Control: گروه کنترل، STZ: گروه دیابتی، STZ + L-Ser: گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین ($P < 0.05$, *).

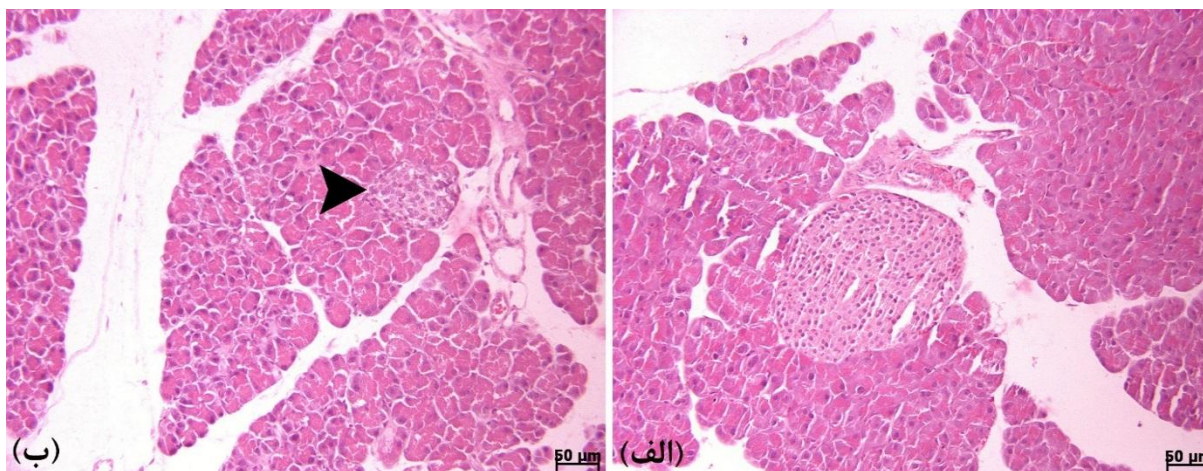
مقدار مالون‌دی‌آلدئید در گروه کنترل (0.44 ± 0.53 μ M/mg protein) و گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین (0.44 ± 0.53 μ M/mg protein) تفاوت معنی‌دار نداشت (شکل ۳).



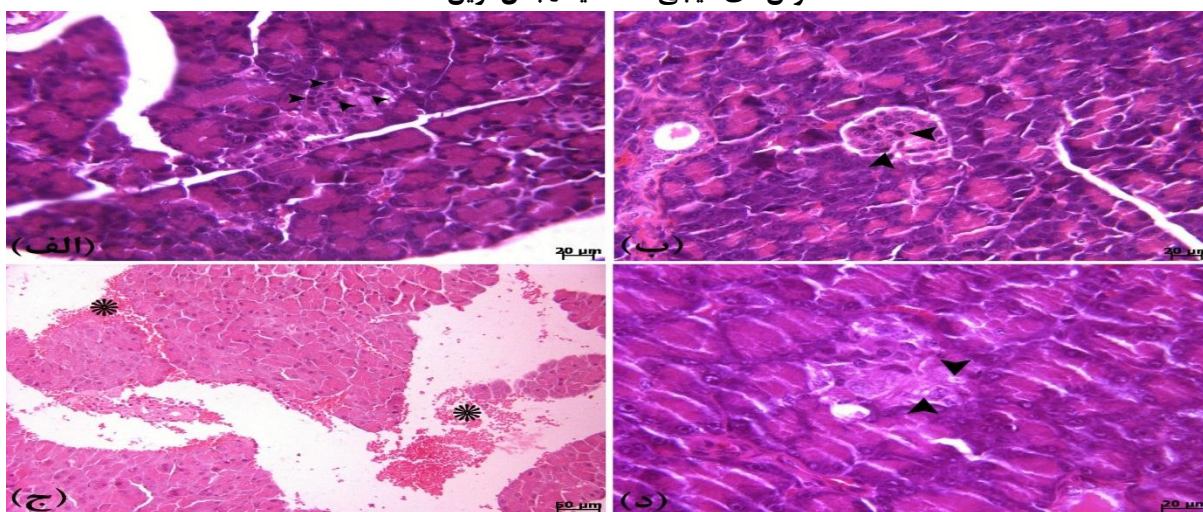
شکل ۳. اثر ال سرین بر مقدار مالون‌دی‌آلدئید در بافت پانکراس (ارزیابی از طریق تست ANOVA و تست تعقیبی دانست). Control: گروه کنترل، STZ: گروه دیابتی، STZ + L-Ser: گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین.

(شکل ۵ (الف-د). در گروه تیمار شده با ال سرین همه این علائم نسبت به گروه دیابتی به صورت خفیف تر مشاهده شد؛ اما همچنان آتروفی در جزایر لانگرهانس در این گروه قابل مشاهده بود (شکل ۵ (ب)، جدول ۲ و ۳).

در رنگ آمیزی H&E مقاطع بافت پانکراس، در گروه کنترل بافت پانکراس به صورت نرمال مشاهده شد (شکل ۴ (الف)). گروه دیابتی بیشترین تغییرات هیستوپاتولوژیک از جمله خونریزی، نکروز و واکوئولاسیون سلول های جزایر لانگرهانس و کاهش تعداد و سایز این جزایر را نشان داد



شکل ۴. (الف) مقطع میکروسکوپی نرمال بافت پانکراس در گروه کنترل (ب) آتروفی (کاهش سایز) جزایر لانگرهانس (سرفلش) در گروه موش های دیابتی تحت تیمار با ال سرین، H&E.



شکل ۵. تغییرات میکروسکوپی بافت پانکراس در گروه دیابتی. (الف و ب): نکروز (سرفلش ها) تعدادی از سلول های جزایر لانگرهانس (ج): خونریزی وسیع (*) در پارانشیم بافت پانکراس (د): واکوئولاسیون سیتوپلاسم (سرفلش ها) در تعدادی از سلول های جزایر لانگرهانس، H&E.

جدول ۲. تعداد و سائز جزایر لانگرهانس در گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

گروه‌های مورد مطالعه	تعداد جزایر لانگرهانس	سائز جزایر لانگرهانس
گروه کنترل	++++	++++
گروه دیابتی	+	+
گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین	++	++

تعداد و سائز جزایر لانگرهانس در ضایعات شدید: +، متوسط: ++، خفیف: +++، بدون ضایعه و نرمال: ++++.

جدول ۳. تغییرات هیستوپاتولوژی بافت پانکراس در گروه‌های مختلف مورد مطالعه.

گروه‌های مورد مطالعه	نکروز سلول‌های جزایر لانگرهانس	واکوئل‌های داخل سیتوپلاسمی	خونریزی
گروه کنترل	-	-	-
گروه دیابتی	++++	+++	++++
گروه دیابتی تحت تیمار با ال سرین	+++	++	+++

شدت نکروز سلول‌های جزایر لانگرهانس، واکوئل‌های داخل سیتوپلاسمی و خونریزی نرمال: -، خیلی کم: +، کم: ++، متوسط: +++، زیاد: ++++.

بحث

در حال حاضر دیابت به یک نگرانی بزرگ جهانی تبدیل شده است و انتظار می‌رود در سال ۲۰۳۵، حدود ۵۹۲ میلیون نفر به این بیماری مبتلا باشند (۲۳). در سال‌های اخیر با وجود پیشرفت چشمگیر پزشکی مدرن و توسعه درمان‌های دارویی، همچنان تلاش برای یافتن داروهای ضد دیابت و مکمل‌های کمک دارویی ادامه دارد. پژوهش‌های صورت گرفته بر روی مکمل ال سرین در چند سال اخیر، بی‌خطر و مؤثر بودن این ماده در کمک به روند درمان بیماری دیابت را نشان داده است (۲، ۸). در دیابت، غلظت ال سرین در پلاسما به طور قابل-توجهی کاهش می‌یابد که علت آن احتمالاً نقص در مسیر گلیکولیز و متعاقباً کاهش پیش ساز سنتز آن (۳-فسفوگلیسرات) است (۲۴-۲۶).

در این مطالعه برای القاء آسیب پانکراس و دیابت از دوز بالای STZ (mg/dl) استفاده شد، به طوری که میانگین قند خون ناشتا در موش‌های دیابتی شده نسبت به موش‌های غیر دیابتی

افزایش معنی‌داری یافت که در راستای مطالعات قبلی بود (۲۷-۲۹). هاپیرگلاسمی در مدل‌های حیوانی مبتلا به دیابت نوع یک، منجر به کاهش ظرفیت دفاع آنتی‌اکسیدانی، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد، پراکسیداسیون لیپیدی و به دنبال آن آسیب سلولی می‌گردد. بروز استرس اکسیداتیو، نقش حیاتی در پاتوژنز و پیشرفت آسیب بافتی ناشی از بیماری دیابت دارد که در اثر به هم خوردن تعادل بین ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی با تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن ایجاد می‌شود (۳۰). ظرفیت تام آنتی‌اکسیدانی شامل همه‌ی آنتی‌اکسیدان‌های آنزیمی (سوپراکسید دسموتاز، کاتالاز، گلوتاتیون پراکسیداز) و غیر آنزیمی (آسکوربات، ویتامین E، گلوتاتیون، پیروات، تورین و هیپوتورین) است که وظیفه حفظ ROS را در غلظت‌های فیزیولوژیک به عهده دارند. این درحالیست که جزایر لانگرهانس پانکراس کمترین میزان بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را نسبت به سایر اندام‌ها در بدن دارند که منجر به حساسیت بیش از حد آن‌ها در مقابل استرس اکسیداتیو و

ژو و همکاران نشان دادند که در اثر مصرف طولانی مدت مکمل ال‌سیرین، مقدار گلوکوتائون به‌عنوان یک ترکیب آنتی-اکسیدان افزایش می‌یابد (۱۷).

بر اساس مطالعات انجام شده، کاهش ال‌سیرین در بروز نوروپاتی دیابتی نقش دارد و نوروپاتی دیابتی می‌تواند منجر به بروز مشکلاتی در اندام‌های مربوط به دستگاه گوارش بدن همچون بافت پانکراس شود (۲۴، ۳۸). در مطالعات گذشته نشان داده شده است که ال‌سیرین می‌تواند استرس اکسیداتیو را در بافت‌های گوناگونی در مدل‌های متنوعی از جوندگان همچون کبد، روده کوچک و هیپوتالاموس کاهش دهد (۱۷، ۳۳). گزارش شده است که افزایش غلظت ال‌سیرین با بهبود ترشح انسولین و حساسیت به آن ارتباط دارد (۱۰، ۳۹)؛ اما تاکنون مطالعه‌ای به بررسی اثر ال‌سیرین بر استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس موش‌های دیابتی نپرداخته است. مطالعه هولم و همکاران نشان داد که با تجویز ال‌سیرین به افراد دیابتی، هاپیرگلیسمی آن‌ها بهبود یافت (۱۰، ۱۹) که هم‌راستا با مطالعه حاضر است. در این مطالعه پس از چهار هفته درمان خوراکی با ال‌سیرین، فعالیت آنزیم آنتی‌اکسیدانی کاتالاز به طور معنی‌داری افزایش یافت و تقریباً به سطح موش‌های کنترل غیر دیابتی رسید که بیانگر روند رو به بهبود شرایط دفاع آنتی-اکسیدانی بافت پانکراس در موش‌های دیابتی است. با این حال، تیمار با ال‌سیرین نتوانست مقدار MDA را به مقدار پایه آن در گروه کنترل غیر دیابتی برگرداند. عدم کاهش معنی‌دار MDA در گروه تحت تیمار با ال‌سیرین ممکن است به دلیل کوتاه بودن طول دوره درمان با ال‌سیرین باشد و به بررسی‌های بیشتری با زمان تیمار طولانی‌تر و دوزهای بیشتر یا چند دوز در روز ال‌سیرین نیاز باشد. در مطالعه‌ی چن و همکاران نشان داده شد که میزان ۱-دئوکسی اسفنگولیپید در پانکراتیت حاد موش‌های دیابتی شده افزایش می‌یابد که در اثر تیمار با ال‌سیرین شرایط پانکراتیت با بهبود نسبی همراه شد (۲)؛ لذا به

بروز دیابت می‌شود (۳۱). MDA به‌عنوان نشانگر اصلی پراکسیداسیون لیپید در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که افزایش سطح آن در موش‌های دیابتی شده نسبت به گروه غیر دیابتی به سطح معنی‌داری نرسید. علاوه-براین، در مطالعه‌ی حاضر نشان داده شد که کاهش فعالیت آنزیم کاتالاز در بافت پانکراس موش‌های دیابتی نیز نسبت به گروه کنترل معنی‌داری نبود. با این حال، در برخی از مطالعات نشان داده شد که میزان فعالیت کاتالاز با دیابتی شدن موش‌ها و رت‌ها در بافت پانکراس کاهش می‌یابد و میزان MDA نیز افزایش می‌یابد (۳۲، ۲۹). در واقع روند دیابتی کردن آن‌ها متفاوت از مطالعه حاضر بود و آن‌ها دیابت را با چند دوز کم و متمادی از STZ القا کردند.

ال‌سیرین یک آمینواسید غیرضروری است که به علت نقش حیاتی آن در حفظ شرایط آنتی‌اکسیدانی، بقا و تکثیر سلول داری ضرورت عملکردی است. ال‌سیرین در کاهش صدمات اکسیداتیو حاصل از به هم خوردن تعادل تولید گونه‌های فعال اکسیژن و نیتروژن با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در بیماران دیابتی نقش دارد (۳۳، ۱۱). این در حالی است که ال‌سیرین در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد (۲۴-۲۶). از آنجایی که نسبت ال‌سیرین به آلانین در بیماران دیابتی کاهش می‌یابد و از آلانین بجای سیرین برای سنتز اسفنگولیپیدها استفاده می‌شود، محصول غیرطبیعی بنام ۱-دئوکسی اسفنگولیپیدی تولید می‌گردد (۲، ۸). اخیراً مطالعات نشان داده‌اند که سطح ۱-دئوکسی اسفنگولیپیدها در بیماران دیابتی افزایش می‌یابد و می‌تواند به‌عنوان نشانگری برای بیماران دیابتی بکار گرفته شود (۳۴-۳۶). در واقع ۱-دئوکسی اسفنگولیپیدها باعث تسریع روند آپوپتوز سلول‌های بتای پانکراس می‌شوند که منجر به کاهش شدید تولید انسولین می‌شود (۱۰، ۳۴). علاوه بر این، ال‌سیرین به‌طور غیرمستقیم در بهبود ظرفیت دفاع آنتی-اکسیدانی سلول نیز نقش دارد؛ زیرا برای سنتز گلوکوتائون و عملکرد گلوکوتائون پراکسیداز لازم است (۱۱، ۱۷، ۳۳، ۳۷).

نظر می‌رسد، ال سرین می‌تواند به عنوان یک مکمل برای بهبود صدمات بافتی پانکراس مورد استفاده قرار گیرد (۱۰).

نتایج به دست آمده از این پژوهش نشان می‌دهد که القای دیابت با استفاده از استرپتوزوتوسین، روی ساختار بافت پانکراس اثرات قابل توجهی دارد. هم‌راستا با مطالعه‌ای که توسط ناصری و همکارانش بر روی تغییرات هیستوپاتولوژیک بافت پانکراس موش‌های دیابتی شده با استرپتوزوتوسین انجام شد، در مطالعه حاضر نیز در بررسی میکروسکوپی بافت پانکراس، آتروفی در جزایر لانگرهانس و کاهش اندازه و تعداد آن‌ها، خونریزی، واکوئولاسیون، تخریب و نکروز سلول‌های جزایر لانگرهانس مشاهده شد (۳۰). نتایج مطالعه ما نشان داد که در گروه تیمار شده با ال سرین شدت خونریزی، واکوئولاسیون و نکروز سلول‌ها نسبتاً بهبود یافت و کاهش اندازه و تعداد جزایر لانگرهانس نسبت به گروه دیابتی خفیف‌تر است؛ اما همچنان آتروفی در این جزایر مشاهده می‌گردد.

نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج هیستوپاتولوژیک به دست آمده از این تحقیق مشخص گردید مصرف مکمل ال سرین در دوز ۲۸۰ میلی گرم به ازای هر موش اثر محافظتی بر آسیب بافت پانکراس ناشی از بیماری دیابت شیرین دارد. همچنین در بررسی فاکتورهای بیوشیمیایی خون مشاهده شد که مصرف این آمینواسید اثر مثبتی بر کنترل قند خون و همچنین بهبود شرایط استرس اکسیداتیو بافت پانکراس دارد. با این حال پیشنهاد می‌گردد که مکانیسم سلولی مولکولی ایجاد استرس اکسیداتیو در بافت پانکراس موش‌های دیابتی مورد بررسی دقیق‌تر قرار گیرد و اثر محافظتی ال سرین در دوره‌های زمانی بیشتر مورد تحقیق قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

کلیه مراحل تحقیقاتی این مطالعه با رعایت ملاحظات اخلاقی مطابق با بیانیه هلسینکی انجام شده است (کد اخلاق: IR.UT.VETMED.REC.1401.012). بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه تهران انجام گرفت.

منابع

1. Piero M, Nzaro G, Njagi J. Diabetes mellitus-a devastating metabolic disorder. Asian j. biomed. pharm. sci. 2015;5(40):1.
2. Chen R, Hornemann T, Štefanić S, Schraner EM, Zuellig R, Reding T, et al. Serine administration as a novel prophylactic approach to reduce the severity of acute pancreatitis during diabetes in mice. Diabetologia. 2020;63(9):1885-99.
3. Noel RA, Braun DK, Patterson RE, Bloomgren GL. Increased risk of acute pancreatitis and biliary disease observed in patients with type 2 diabetes: a retrospective cohort study. Diabetes care. 2009;32(5):834-8.
4. Betteridge DJ. What is oxidative stress? Metabolism. 2000;49(2):3-8.
5. Eguchi N, Vaziri ND, Dafoe DC, Ichii H. The role of oxidative stress in pancreatic β cell dysfunction in diabetes. Int. J. Mol. Sci. 2021;22(4):1509.
6. Lenzen S. Oxidative stress: the vulnerable β -cell. Biochem. Soc. Trans. 2008;36(3):343-7.
7. Fu Z, R Gilbert E, Liu D. Regulation of insulin synthesis and secretion and pancreatic Beta-cell dysfunction in diabetes. Curr. Diabetes Rev. 2013;9(1):25-53.
8. Zuellig RA, Hornemann T, Othman A, Hehl AB, Bode H, Güntert T, et al. Deoxysphingolipids, novel biomarkers for type 2 diabetes, are cytotoxic for insulin-producing cells. Diabetes. 2014;63(4):1326-39.

9. De Koning TJ, Snell K, Duran M, Berger R, Poll-The B-T, Surtees R. L-serine in disease and development. *Biochem. J.* 2003;371(3):653-61.
10. Holm LJ, Buschard K. L-serine: a neglected amino acid with a potential therapeutic role in diabetes. *Apmis.* 2019;127(10):655-9.
11. Zhou X, He L, Wu C, Zhang Y, Wu X, Yin Y. Serine alleviates oxidative stress via supporting glutathione synthesis and methionine cycle in mice. *Mol. Nutr. Food Res.* 2017;61(11):1700262.
12. Calabrese V, Cornelius C, Leso V, Trovato-Salinaro A, Ventimiglia B, Cavallaro M, et al. Oxidative stress, glutathione status, sirtuin and cellular stress response in type 2 diabetes. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* 2012;1822(5):729-36.
13. Jensen-Waern M, Andersson M, Kruse R, Nilsson B, Larsson R, Korsgren O, et al. Effects of streptozotocin-induced diabetes in domestic pigs with focus on the amino acid metabolism. *Lab. Anim.* 2009;43(3):249-54.
14. Bervoets L, Massa G, Guedens W, Louis E, Noben J-P, Adriaenssens P. Metabolic profiling of type 1 diabetes mellitus in children and adolescents: a case-control study. *Diabetol Metab Syndr.* 2017;9(1):1-8.
15. Drábková P, Šanderová J, Kovařík J, Kanďár R. An assay of selected serum amino acids in patients with type 2 diabetes mellitus. *Adv. Clin. Exp. Med.* 2015;24(3):447-51.
16. Maralani MN, Movahedian A, Javanmard SH. Antioxidant and cytoprotective effects of L-Serine on human endothelial cells. *Res Pharm Sci.* 2012;7(4):209.
17. Zhou X, Zhang H, He L, Wu X, Yin Y. Long-term l-serine administration reduces food intake and improves oxidative stress and Sirt1/NFκB signaling in the hypothalamus of aging mice. *Front. Endocrinol.* 2018;9:476.
18. Kim KY, Hwang S-K, Park SY, Kim MJ, Kim YH. l-Serine protects mouse hippocampal neuronal HT22 cells against oxidative stress-mediated mitochondrial damage and apoptotic cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 2019;141:447-60.
19. Holm LJ, Haupt-Jorgensen M, Larsen J, Giacobini JD, Bilgin M, Buschard K. L-serine supplementation lowers diabetes incidence and improves blood glucose homeostasis in NOD mice. *PLoS One.* 2018;13(3):e0194414.
20. Kenneth K. Wu YH. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Curr. Protoc;* 2008. p. Unit 5.47.
21. Langroudi FE, Narani MS, Kheirollahi A, Vatannejad A, Shokrpour S, Alizadeh S. Effect of l-serine on oxidative stress markers in the kidney of streptozotocin-induced diabetic mice. *Amino Acids.* 2023:1-8.
22. Kakkar R, Mantha SV, Radhi J, Prasad K, Kalra J. Increased oxidative stress in rat liver and pancreas during progression of streptozotocin-induced diabetes. *Clin. Sci.* 1998;94(6):623-32.
23. Martins IJ. *Diabetes and Clinical Studies.* 2035.
24. Holeček M. Serine Metabolism in Health and Disease and as a Conditionally Essential Amino Acid. *Nutrients.* 2022;14(9):1987.
25. Holeček M, Vodeníčarovová M, Fingrová R. Dual effects of beta-hydroxy-beta-methylbutyrate (HMB) on amino acid, energy, and protein metabolism in the liver and muscles of rats with streptozotocin-induced type 1 diabetes. *Biomolecules.* 2020;10(11):1475.
26. Scharff R, Wool IG. Effect of diabetes on the concentration of amino acids in plasma and heart muscle of rats. *Biochem. J.* 1966;99(1):173.

- 27.Campos K, Diniz Y, Cataneo A, Faine L, Alves M, Novelli E. Hypoglycaemic and antioxidant effects of onion, *Allium cepa*: dietary onion addition, antioxidant activity and hypoglycaemic effects on diabetic rats. *Int J Food Sci Nutr*. 2003;54(3):241-6.
- 28.Akcilar R, Turgut S, Caner V, Akcilar A, Ayada C, Elmas L, et al. The effects of apelin treatment on a rat model of type 2 diabetes. *Adv. Med. Sci*. 2015;60(1):94-100.
- 29.Ghanbari E, Nejati V, Khazaei M. Improvement in serum biochemical alterations and oxidative stress of liver and pancreas following use of royal jelly in streptozotocin-induced diabetic rats. *Cell J*. 2016;18(3):362.
- 30.Naseri M, Sereshki ZK, Ghavami B, Zangii BM, Kamalinejad M, Moghaddam PM, et al. Preliminary results of effect of barley (*Hordeum vulgare* L.) extract on liver, pancreas, kidneys and cardiac tissues in streptozotocin induced diabetic rats. *Eur. J. Transl. Myol*. 2022;32(1).
- 31.Lenzen S, Drinkgern J, Tiedge M. Low antioxidant enzyme gene expression in pancreatic islets compared with various other mouse tissues. *Free Radic. Biol. Med*. 1996;20(3):463-6.
- 32.Ramachandran B, Ravi K, Narayanan V, Kandaswamy M, Subramanian S. Protective effect of macrocyclic binuclear oxovanadium complex on oxidative stress in pancreas of streptozotocin induced diabetic rats. *Chem. Biol. Interact*. 2004;149(1):9-21.
- 33.Zhou X, Zhang Y, He L, Wan D, Liu G, Wu X, et al. Serine prevents LPS-induced intestinal inflammation and barrier damage via p53-dependent glutathione synthesis and AMPK activation. *J. Funct. Foods*. 2017;39:225-32.
- 34.Mwinyi J, Boström A, Fehrer I, Othman A, Waeber G, Marti-Soler H, et al. Plasma 1-deoxysphingolipids are early predictors of incident type 2 diabetes mellitus. *PloS one*. 2017;12(5):e0175776.
- 35.Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, Drexel H, von Eckardstein A, et al. Plasma 1-deoxysphingolipids are predictive biomarkers for type 2 diabetes mellitus. *BMJ Open Diabetes Res Care*. 2015;3(1):e000073.
- 36.Wei N, Pan J, Pop-Busui R, Othman A, Alecu I, Hornemann T, et al. Altered sphingoid base profiles in type 1 compared to type 2 diabetes. *Lipids Health Dis*. 2014;13(1):1-4.
- 37.Cao G, Tao F, Xin L, Li Z, Zhou X. Effects of maternal serine supplementation on high-fat diet-induced oxidative stress and epigenetic changes in promoters of glutathione synthesis-related genes in offspring. *J. Funct. Foods*. 2018;47:316-24.
- 38.Bertea M, Rütti MF, Othman A, Marti-Jaun J, Hersberger M, von Eckardstein A, et al. Deoxysphingoid bases as plasma markers in diabetes mellitus. *Lipids Health Dis*. 2010;9(1):1-7.
- 39.Vangipurapu J, Stancáková A, Smith U, Kuusisto J, Laakso M. Nine amino acids are associated with decreased insulin secretion and elevated glucose levels in a 7.4-year follow-up study of 5,181 Finnish men. *Diabetes*. 2019;68(6):1353-8.